

Title	VII. 共同利用研究, 2.研究成果, (4)随時募集研究
Author(s)	
Citation	霊長類研究所年報 = Annual Reports of the Primate Research Institute Kyoto University (2017), 47: 116-122
Issue Date	2017
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/236445">http://hdl.handle.net/2433/236445</a>
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

シナティール大学・医)、大木淳子、熊木峻佑、難波みつき(東京農業大学・応生・食品安全健康)

所内対応者: 今井啓雄

本研究の目的は、霊長類から腸管オルガノイドを作製し、*ex vivo*において食品因子などに対する腸管細胞の応答性を解析することである。霊長類から腸管オルガノイドを作製することにより、げっ歯類では解析不能であったヒトに近い細胞でのアッセイが可能となると考えられる。

前年度までにアカゲザルの腸管よりオルガノイドの作製に成功したが、継代すると細胞は増えず、げっ歯類とは異なる培養条件や継代条件を確立する必要が生じていた。そこで、平成28年度では、ニホンザルの腸管を出発材料に様々な実験条件を設定することで、霊長類に適した培養方法や継代法を見いだすことに成功した。具体的には、培地に添加する Wnt3a の活性や BSA の種類により、霊長類腸管オルガノイドの増殖活性が変化することが明らかとなった。げっ歯類腸管オルガノイドは Wnt3a や BSA の添加を必要とせず、霊長類オルガノイドを培養する際に注意すべき点である。また、継代法に関しては、Trypsin を使い単一細胞にする方法にて継代が安定した。これもシリンジ等を使い物理的にクリプトを分離するするげっ歯類オルガノイドの継代法とは異なる点である。現在、増殖活性の強いオルガノイドから最終分化した細胞を効率よく誘導させるため様々な培養条件を検討している。

#### D. 随時募集研究

##### 2016-D-1 サルの脅威刺激検出に関する研究

川合伸幸(名古屋大・院・情報科学) 所内対応者: 香田啓貴

ヒトがヘビやクモに対して恐怖を感じるのには生得的なものか経験によるのか長年議論が続けられてきた。我々は、ヘビ恐怖の生得性は認識されていることを示すために視覚探索課題を用いて、ヒト幼児や(ヘビを見たことのない)サルがヘビの写真をはかの動物の写真よりもすばやく検出することをあきらかにし、ヒトやサルが生得的にヘビに敏感であることを示した。しかし、ヘビをすばやく検出する視覚システムは、ヘビのカモフラージュを見破れるようにできているのかは不明である。我々はヒト成人は、ほかの動物に比べてノイズを混ぜた写真からヘビを正確に認識できることを示した。このことをサルで検証した。4頭で見本合わせ課題を習得させた。1頭はまだ見本合わせ課題の習得段階である。3頭でテストが終了した。見本刺激と2つの選択肢を対応させる課題で、グローブテストとして、見本刺激にさまざまな量(10-50%)のノイズを混ぜてどれだけ認識できるかを調べたところ、1頭はノイズが多くなってもヘビの認識がもっともすぐれたが、別の1頭はむしろヘビの認識がもっとも劣った。残りの1頭のヘビの認識率は中間であった。見本刺激と選択刺激を直接対応させる課題でははっきりした結果は得られなかった。そこで、H29年度は見本刺激を消した後に選択肢を提示し、記憶と照合する課題でヘビの認識がすぐれるかを検証する。

##### 2016-D-3 Connecting the dots: linking host behaviour to parasite transmission

Julie Dubosq (KUWRC) 所内対応者: Andrew MacIntosh

Investigating infectious disease dynamics is important for managing health of livestock, wildlife, and humans, as well as species/habitat conservation, public health and economic issues. For this project, we studied simian foamy virus (SFV) and *Escherichia coli* infection patterns in Japanese (and Rhesus) macaques to understand: 1/ factors determining intensity, prevalence and diversity of pathogens in relation to individual and social network characteristics, and 2/ infection risk and transmission pathways of pathogens within social networks. We focused on socially-transmissible parasites that are endemic and relatively host-specific. They are of low virulence but nevertheless monopolize host resources and are not without fitness consequences. These organisms further provide a good model to examine transmission dynamics. Initially, we planned to conduct the study at Koshima, but data collection proved too complicated for a one-year project. During a short visit, we collected a few fecal samples and have stored them at the Primate Research Institute for reference. Instead, we switched our focus to captive macaques at KUPRI where I collected behavioural and biological samples on two social groups. We are now establishing SFV and *E. coli* genetic profiles for each host, and matching them to individual (age, sex) and social (centrality in aggression and grooming networks) characteristics to determine transmission pathways. Preliminary data show that 56/58 adults (>4yo), 30/34 juveniles (1-4yo) and 7/22 infants (<1yo), as well as 63/75 females and 30/39 males tested positive for SFV. Preliminary data on 15 Rhesus and 16 Japanese macaques showed that dyads that groomed more and that were of similar age shared more similar virus strains than others, whereas aggression frequency, kinship, or dominance rank did not seem to affect strain similarity. These effects may be linked to 1/ a higher risk of transmission between individuals in frequent active body contact and 2/ natural viral strain evolution, some strains existing predominantly in some years but not in others. This research can inform animal population management and welfare as well as give insight into evolutionary pressures on sociality and parasitism in animal groups.

##### 2016-D-4 レトロエレメント由来の獲得遺伝子の霊長類における分布解析

石野史敏(東京医歯大・難研)、金児-石野知子(東海大・健康科学)、李知英(東京医歯大・難研)、入江将仁(東京医歯大・難研、東海大・健康科学) 所内対応者: 古賀章彦

ヒトゲノムにはレトロエレメント由来の獲得遺伝子群である11個のSIRH遺伝子が含まれる。これらの多くは真獣類特異的の遺伝子であり、近年の研究から、ヒトやマウスを含む真獣類の個体発生機構の様々な特徴(胎生や高度の脳機能など)に深く関係する機能を持つことが明らかになってきた。そのため、真獣類の進化を促した遺

伝子群である可能性が高いと考えている。脳で発現し行動に関係する *SIRH11/ZCCHC16* は、南米に生息する異節類において偽遺伝子化しているが(Irie et al. PLoS Genet 2015)、本年度の共同研究においては、異節類に加え、北方獣類でも系統特異的に大きな変異や欠失があることを明らかにした。その中で、霊長類では南米の新世界ザルでは N 末領域の大きな欠失、テナガザルの系統では C 末の RNA 結合モチーフの欠失や遺伝子全体の欠失があることを明らかにした。*Sirh11/Zcchc16* は脳におけるノルアドレナリン量の調節を介して認知機能に関係していることから、霊長類の行動進化にも直接関係する可能性が高いと考えている (Irie et al. Front Chem 2016)。

#### 2016-D-5 脂質を標的としたサル免疫システムの解明

杉田昌彦、森田大輔(京都大・ウイルス再生研・細胞制御) 所内対応者: 鈴木樹理

本研究グループは、アカゲザルにおいて、サル免疫不全ウイルス由来のリボペプチドを特異的に認識する T 細胞の存在を明らかにし、その分子機構の解明を目指した研究を展開してきた。まずリボペプチド特異的 T 細胞株の抗原認識を阻害するモノクローナル抗体を作出しその生化学的解析を進めた結果、その認識抗原がアカゲザル MHC クラス 1 分子であることを見出した。そこでアカゲザル末梢血単核球より MHC クラス 1 遺伝子群を単離し、それぞれをトランスフェクトした細胞のリボペプチド抗原提示能を検証することにより、2 種のリボペプチド提示アカゲザル MHC クラス 1 アリルを同定した。そのうちの一つについては、リボペプチドを結合させた複合体の X 線結晶構造解析を昨年完了し、リボペプチド結合様式を解明した (Nature Communications. 7:10356, 2016)。本年度、もう一つのリボペプチド提示分子について、X 線結晶構造の決定に成功した (投稿準備中)。さらに、この分子に結合する内因性リガンドとして非ペプチド小分子を同定した (投稿準備中)。アカゲザルの新たな免疫システムを解明した本研究成果は、免疫学の基本パラダイムの一つである MHC クラス 1 分子によるペプチド抗原提示の固定的概念に修正を加える必要があることを示している。

#### 2016-D-6 ヒト動脈硬化症のアカゲザルモデル作出のための基礎研究

日比野久美子、竹中晃子(名古屋文理大学・短期大学部) 所内対応者: 鈴木樹理

低密度リポたんぱく質受容体 (LDLR) の LDL との結合部位であるエクソン 3 領域に Cys61Tyr 変異を有する家族性高コレステロール(Ch)血症を示すインド産アカゲザル家系(7 頭)が動脈硬化症のモデル動物となりうるかを調べてきた。Ch を含まない通常食においても血中総 Ch(t-Ch)値、LDL 値は有意に高いが、動脈硬化指数 LDL/HDL>3.5、t-Ch/HDL>5.0 とはならない。H25、H26 年には 0.1%Ch 含有食を投与したところ、ヘテロ接合型♂#1784 のみが投与 7 週目で動脈硬化指数を超えた。#1834 は LDL 値は同様に上昇したが、HDL 値が若干高く指数に達しなかった。今年度はホモ個体を含む 4 頭に 0.3%Ch を投与したところ、#1834 は 11 週目以降指数を超えた。したがって、ヘテロ接合型#1784 (♂)と#1834 (♂)はモデル動物となりうるということが明らかとなった。しかし、唯一のホモ接合個体#2041(3 歳)の LDL 値は正常個体と変わらず、考察した結果、年齢の影響の可能性が示唆された。正常マカカ属サル 500 頭で調べた結果からは 6~7 歳まで t-Ch 値 (LDL 値)が約 2 割低下し続けることを以前明らかにしているので、H29 年度には 4 歳同年齢の正常、ヘテロ、ホモ接合型の 3 頭について 0.3%Ch 含有食を投与し、血中リポたんぱく質中に含まれる Ch 値を求め、ホモ接合型の LDL 値が高いことを確認する予定である。ホモ接合型#2041 は♀であり、HDL 値は低く成長により変化しにくいことから、将来成熟した折には動脈硬化指数の高い個体の繁殖のための重要な一員となりうることを期待したい。

#### 2016-D-7 野生チンパンジーの老齢個体の行動及び社会的地位の研究

保坂和彦(鎌倉女子大・児童) 所内対応者: Michael A. Huffman

本年度は前年度に実施したマハレ (タンザニア) のチンパンジー調査で得た資料の整理を進めつつ、霊長研図書室の協力を得て、関連文献を収集した。本課題を申請した時点で生存していた 50 歳超の老齢雌 3 頭は相次いで消失し、現在は 40 代の雌が 2 頭いるのみである。生存雄の最高齢は 38 歳である。50 歳超の老齢個体に焦点を合わせることはできなくなったため、今後は広い年齢の成熟個体について生存率・社会行動・採食・繁殖等が年齢に伴ってどのように変化するかを研究していきたい。文献としては、ンゴゴ (ウガンダ) のチンパンジーに関する最新報告 (Wood et al.2017) が重要である。ンゴゴにおける最長寿命は 66 歳を記録した。マハレにおける最長寿命記録は 55 歳であるが、これが過小評価である可能性 (Hosaka & Huffman 2015)を考慮すれば、チンパンジーの潜在寿命は 60 代半ばを超えるものと結論できる。また、Wood らは、ンゴゴのチンパンジーが示す確率論的生存曲線のパターンが狩猟採集民のものとよく似ていることを示唆した。マハレについて Nishida ら(2003)が示した生存曲線は若い世代の死亡率が高いことが特徴であったため、このような地域間の違いをもたらし要因が何であるか探ることが今後の課題と思われる。

#### 2016-D-8 飼育下にあるオスオランウータンの第二性徴におけるフランジ発達過程と性ホルモン濃度動態との関連性について

黒鳥英俊(茨城大学・農) 所内対応者: 木下こづえ

フランジ成長期の雄オランウータンのテストステロン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、およびジヒドロテストステロン濃度はアンフランジ雄よりも高いことが知られている (Maggioncalda AN et al., 2000)。しかしフランジの成長過程におけるこれらホルモンの濃度動態は調べられていない。

そこで本研究では、フランジ成長期にあった1個体の雄の尿について、テストステロンおよびコルチゾール濃度を測定し、フランジ成長との関連性を調べた。その結果、特にテストステロンについて、フランジが成長するにつれて濃度上昇が認められた。また、アンフランジおよびフランジ雄の成長ホルモン濃度の測定を追加し、フランジ成長との関連性を検証した。成長ホルモン濃度測定には、ヒト用の市販測定キットを使用した。その結果、すでにフランジ雄であった個体では低濃度しか検出されず、測定キットの検出限界値以下を推移していた(<2.5 ng/ml)。一方、フランジ成長期にあった個体では、フランジ成長が認められてから約1年後以降から高濃度の値を連日で検出した(115.7–399.0 ng/ml)。ただし、それ以外の期間では、ほとんどの日でフランジ雄と同様に検出限界値以下の低値を示していた(<2.5 ng/ml)。本研究結果により、フランジ成長過程において、フランジ成長がある程度進んだ雄において、成長ホルモンの分泌が認められることが判明した。

#### 2016-D-9 下肢骨格筋の形態と支配神経パターンの解析

荒川高光、幅大二郎(神戸大・院・保健) 所内対応者: 平崎鋭矢

アカゲザル個体とチンパンジー個体の下肢骨格筋、とくに足底筋とヒラメ筋の形態と支配神経の解析を引き続き行った。ヒトでの足底筋欠如例における足底筋支配神経はヒラメ筋への支配神経の前枝(ヒトで恒常的)に取り込まれた可能性を探るため、ヒラメ筋の支配神経の詳細な分類を試みた。その中で、ヒラメ筋の遠位部、踵骨腱周辺に入る神経が見つかるため、詳細に実体顕微鏡下でその分布領域を観察した。すると、踵骨腱周辺の枝はほとんどが踵骨腱に分布する知覚枝ではないか、と思われた。なぜなら、その分布する領域には筋束がほとんどなく、神経が腱内で自由に放散している形態を観察したからである。今後も詳細に観察を続けていきたい。

#### 2016-D-10 Bergmann's rule in skull size and clinal variation in skull shape of wild vs. captive fascicularis group macaques

Julia Arenson, Stephen Frost, Frances White (University of Oregon) 所内対応者: 伊藤毅

The aim of this study was to explore geographic variation in skull shape and size in fascicularis-group macaques. I collected 45 3D landmark coordinates over the cranium and used multivariate statistics to explore the relationship between geographic and anatomical landmarks. In addition, I landmarked two populations of translocated captive macaques, in Puerto Rico and Beaverton, OR and compared them to the wild cline. Both cranial size and shape are correlated with latitude in the wild populations. The translocated captive macaques were larger than expected, but were similar in shape to the wild population of origin, suggesting the cline in shape is evolutionary while the size cline may be more plastic. I came to the Kyoto PRI to collect additional samples of *Macaca fuscata*, to increase my sample size and confirm the preliminary results of my project.

#### 2016-D-11 霊長類細胞におけるDNA損傷応答・細胞老化の解析

小林純也(京都大学放射線生物研究センター) 所内対応者: 平井啓久

放射線をはじめ様々な環境ストレスでゲノムDNAは損傷を受けるが、正常な遺伝情報を保つ(ゲノム安定性)ために生物は損傷したDNAを修復する能力を持つ。しかし、このような修復能力は加齢により減退し、その結果、DNA損傷が蓄積し細胞老化が起こると考えられる。一方で、遺伝子は常に正確に修復・複製されると進化に必要な遺伝子の多様性がうまれないことから、修復・複製の正確度にはある程度の幅があって、ゲノム安定性と遺伝的多様性の間でバランスがとられている可能性がある。このようなDNA損傷応答能・修復能と細胞老化、ゲノム安定性・遺伝的多様性の関係を探るために、本研究ではヒトを含む霊長類繊維芽細胞でDNA損傷応答能の差異を検討することを計画した。

平成28年度は平井啓久先生の研究室からチンパンジー(大型類人猿)、アカゲザル(旧世界ザル)、コモンマーモセット(新世界ザル)、リスザル(新世界ザル)、オオガラゴ(原猿)由来初代培養繊維芽細胞を凍結ストックとして提供を受けた後、培養方法について検討を行い、安定して細胞を維持できる培養方法を確立した。また、確立した培養法を用いて、若い継代数(PDL)の細胞の凍結ストックの作製を行った。さらに、DNA損傷応答・DNA修復能の解析の多くは抗体を用いて行うが、我々のこれまでの研究に用いてきたヒトタンパクに対する抗体が他の霊長類種でも使用可能かを検討するために、ヒト及び旧世界ザル由来のトランスフォーム細胞株を用いて、抗体の交差性を検討した。その結果、DNA損傷応答キナーゼでリン酸化されるKAP1, Chk2, Chk1のリン酸化に対する抗体は旧世界ザル由来細胞でも使用可能であった。また、DNA損傷応答の中心因子、NBS1, MRE11, RAD50に関してもヒトタンパクに関する抗体が使用可能であることがわかった。平成29年度の共同利用・共同研究でこれらの抗体を用いて、霊長類細胞間でのDNA損傷応答の差異について、検討する計画である。

#### 2016-D-12 二卵性ふたごチンパンジーの行動発達に関する比較認知発達研究

岸本健(聖心女子大学・文)、安藤寿康(慶應義塾大学・文)、多々良成紀、山田信宏(高知県立のいち動物公園) 所内対応者: 友永雅己

高知県立のいち動物公園では、2009年4月に、母親サンゴが二卵性(雌雄)のふたごチンパンジーである女兒サクラと男児ダイヤを出産した。2017年2月、サクラが多摩動物公園へ移動するまでの約8年間、ふたごは母親サンゴにより養育された。本申請課題の目的は、母親によるふたごの養育とふたごの発達の経過について縦断的に検討することであった。



7 歳齢となったふたごの近接関係について検討するために、2016 年度には 33 回のスキャンサンプリングを実施し、近接率（2 者が手の届く範囲にいる割合）を算出した。この近接率を 2011 年度から 2015 年度までのものと比較した結果、ふたご同士の近接率は減少していたものの、ふたごと他のおとなとの近接率と比べ依然、高い値であった。また、ふたごと母親サンゴとの近接率は、サクラに関しては 2015 年度（6 歳齢時）と同程度であったが、ダイヤに関しては減少していた。一方で、ふたごの父親であるロビンとふたごとの近接率が上昇していた。この傾向は、特に男児ダイヤに関して顕著であった。これらの結果は、ふたごのうち、特に男児ダイヤが、母親サンゴへの依存を減らし、ロビンとの間で、遊びなどの社会交渉に割く時間を増やしていたことを示唆する。

#### 2016-D-13 内在性レトロウイルスが関与する霊長類進化

中川草（東海大・医）、上田真保子（東海大・マイクロ・ナノ）、宮沢孝幸（京大・ウイルス）、下出紗弓（神戸大・医）坂口翔一（東京農業大・国際家畜感染症センター） 所内対応者：岡本宗裕

本共同研究に基づき、今年度はアカゲザルの帝王切開時の胎児試料を中心に、下記のサンプルの RNA を抽出した：大脳、小脳、胎盤[母親側、中間、胎児側]、筋肉、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、皮膚  
本来は全てのサンプルを次世代シーケンサで転写産物の RNA-seq を行いたいと計画しているが、予算の関係で、現在大脳、小脳、胎盤（母・胎児側）、筋肉を次年度にそれぞれ 2 サンプルずつイルミナ HiSeq4000 を使って大規模シーケンスを行う予定である。その後、発現している内在性レトロウイルスに由来する配列を大規模に同定し、機能解析を行う予定である。

#### 2016-D-14 霊長類の網膜の形成と維持を制御する分子機能の解析

古川貴久、大森義裕（大阪大・蛋白研） 所内対応者：大石高生

黄斑は網膜の中央部に存在するキサントフィルという色素が豊富にある直径 1.5-2mm 程度の領域である。この部分は、角膜から入射した光がレンズで屈折し焦点を結ぶ位置となる。黄斑では、錐体視細胞の密度が高く黄斑部では解像度が高い。ヒトを含む霊長類には黄斑が存在し、高精度な視力を発揮することができる。また、黄斑の異常はヒトにおいて黄斑変性を含む網膜疾患の原因となる。マウスを含む霊長類以外の哺乳類では黄斑は存在せず、黄斑の発生・維持のメカニズムはほとんど明らかになっていない。アカゲザルまたは、ニホンザル、コモンマーモセットなどの霊長類の網膜を RNA-seq 解析、蛍光免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション解析等を行うことで、黄斑に発現する特異的な遺伝子群の同定を試みる。特に錐体細胞の発生・維持・機能に重要な役割を果たす遺伝子の同定を目指す。

昨年度は、適当な年齢の個体がなく、動物実験は実施できなかったことから、研究の直接の進展はなかった。本年度は、サンプルを得て実験を進展させる予定である。

#### 2016-D-15 内在性ボルナウイルスによるウイルス感染抑制メカニズムの解明

朝長啓造、小嶋将平（京都大学ウイルス・再生医科学研究所） 所内対応者：今井啓雄

本共同研究は、霊長類に内在しているボルナウイルス様配列（EBLs）の機能を明らかにすることを目的に行われた。ヒトゲノムに存在する EBLs は、臓器および培養細胞で発現し、抗ウイルス作用などの機能を有することが当研究室において明らかとなっている。しかし、ヒト以外の真猿亜目に属するサルにおいてその配列、発現、および機能はまだ明らかとなっていない。そこで本研究では、新世界ザル、および類人猿由来の培養細胞を用い、これらに内在化した EBLs の探索、配列決定、発現解析、および機能の解析を目的として行った。分与されたチンパンジー、ゴリラならびにマーモセット由来の繊維芽細胞よりゲノム DNA を抽出し、EBLs の配列を PCR 法により同定を行った。また RNA を抽出し、RT-PCR 法により EBLs 領域からの RNA 発現を確認した。また、それらの結果をもとに、EBLs の配列の保存やプロモーターの保存について進化的解析を遂行した。その結果、分与された細胞においては、ヒトで見られるすべての EBLs が同じ遺伝子局座に内在化していることが明らかとなった。また、その中で hsEBLN-3 と名付けられたヒト EBLs の相同遺伝子は、これら真猿亜目の細胞において mRNA を発現していることが明らかとなり、機能を有している可能性が示された。現在、これら真猿亜目において検出された hsEBLN-3 相同遺伝子をクローニングすることにより、その機能解明を進めている。

#### 2016-D-16 マーモセット幼若精細管のマウスへの移植後の精細胞発生の観察

小倉淳郎、越後真成美（理研バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室） 所内対応者：中村克樹

最近我々は、顕微授精技術を用いることにより、マーモセット体内で自然発生した生後 1 年前後の精子・精子細胞（未成熟精子）から受精卵が得られること明らかにした。そこで本研究では、さらに早期に顕微授精を行う可能性を検討するために、性成熟の早いマウスへ新生仔マーモセット未成熟精細管を移植し、精祖細胞からの精子・精子細胞発生が加速するかどうかを確認した。生後 5 ヶ月齢の雄マーモセット 1 匹より手術にて片側精巣を摘出し、免疫不全マウスである NOD/scid の雄 2 匹の陰嚢腔に移植を行った。1 匹は移植後 2 週間で体重減少が確認され、安楽殺後、移植組織を摘出して再移植を試みた。レシピエントマウスを解剖した結果、胸腺肥大が確認された。再移植レシピエントも 2 ヶ月で体重の減少が認められ再び別のマウス個体へ移植変えを行った。最初の移植より約 4 ヶ月後に 2 匹のレシピエントを安楽殺して、移植組織の組織形態、精子細胞の発生程度の確認を行った。計 3 回の移植を行った組織は T 細胞の増殖が確認された。また、4 ヶ月間同一個体に移植した組織は、精巢

としての形態サイズの変化は認められず、精細胞も移植時からほぼ発生していない状態であった。

今回の結果より、マーマセット組織の移植によりレシピエントマウスに免疫拒絶反応が起きたことが予想された。よってこれ以降はNOD/scidよりさらに重度の免疫不全を示し、異種組織の受容度が高いNOGあるいはNSG系統をレシピエントマウスとして利用することとした。生後7ヶ月齢の雄マーマセット1匹より手術にて片側精巣を摘出し、NSGの雄2匹の陰嚢腔に移植を行った。現時点で移植後6週を経過したが、レシピエントの体重・体調変化は認められていない。レシピエントマウスの体調によるが、移植後6ヶ月以降で移植組織を回収、組織標本作製して精子発生について、生体内での自然発生と比較する予定である。

#### 2016-D-17 哺乳類の肩甲骨の材料力学的特徴および肩帯周辺筋の locomotion との関係

和田直己（山口大・共同獣医） 所内対応者：西村剛

肩甲骨に関する研究（研究タイトル：哺乳類の肩甲骨の材料力学的特徴および肩帯周辺筋の locomotion との関係）に用いられた番号No. 90009、9783、90008、10042、10042の標本については他の約160種の哺乳類のデータとともに現在、論文の作業中である。肩甲骨、周辺筋肉のデータと動物のサイズ、系統、生息域（ロコモーション）との関係を明らかにするのが目的である。

寛骨に関する研究（研究タイトル：哺乳類の寛骨と脊柱（椎体）の形態と移動運動）に用いた番号90010、90010、90012、90012、10042の標本については現在、統計的作業中である。肩甲骨の研究と同様、多くの哺乳類のデータを収集し解析することで研究目標は達成される。寛骨についてはまだ改正された動物種は45であり、これから100種以上のデータ解析が必要となる。椎骨については頸椎から尾椎までのデータ収集が必要で作業が始まった段階である。

モメントバランスについての研究（研究タイトル：哺乳類のモメントバランスとロコモーション）に使用したNo. 10042、90017の検体についても上記のデータと同様多くのデータが必要となる。モメントの算出には検体が必要であるがゴリラについては早期返却が要求されたために求められないが、現在データ収集中である。

#### 2016-D-18 野生オランウータンの繁殖生理と栄養状態に関する生理学的研究類人猿における骨盤の耳状面前溝の性差および種差

五十嵐由里子（日本大学松戸歯学部）、久世濃子（国立科学博物館） 所内対応者：西村剛

ヒトでは、骨盤の仙腸関節耳状面前下部に溝状の圧痕が見られることがあり、特に妊娠・出産した女性では、深く不規則な圧痕（妊娠出産痕）ができる。直立二足歩行に適応して骨盤の形態が変化し、産道が狭くなった為にヒトは難産になった、と言われている。妊娠出産痕もこうしたヒトの難産を反映した、ヒト経産女性特有の形態的特徴であると考えられてきた。しかし、我々は、平成27年度までに京都大学霊長類研究所や国内の博物館、動物園等に収蔵されていた大型類人猿3属39個体の耳状面前下部を観察し、大型類人猿でも耳状面前下部に圧痕が見られることを確かめた（圧痕があった個体；ゴリラ：6、チンパンジー：6、オランウータン：0）。本研究では、圧痕の形成要因を調べる為に、類人猿の遺体を解剖し、耳状面に付着する筋肉や靱帯の状況を調べた。平成28年度はチンパンジー4個体（雄2、雌2）、ゴリラ1個体（雄）、オランウータン1個体（雌）の計6個体を観察した。その結果、3属ともに、耳状面にはヒトのように分厚い靱帯が付着することではなく、圧痕が形成されている場合は、筋肉や筋膜が直接、圧痕に入り込んでいることを確認した。以上から類人猿の圧痕の形成過程は、ヒトとは異なっている可能性がある。今後は更にサンプル数を増やし、類人猿での種間差を立証し、圧痕の形成要因を明らかにしたいと考えている。

#### 2016-D-19 蛍光標識マルチプレックス PCR による新規動物種識別法の開発

森幾啓（岐阜大大学院・連合農学研究科・動物遺伝学研究室） 所内対応者：今井啓雄

網羅的な動物種の同時識別法を開発するために、ミトコンドリア DNA をターゲットとした蛍光標識マルチプレックス PCR によるフラグメント解析を行った。

哺乳類9種類について、ミトコンドリアゲノム中の Cytochrome b 遺伝子領域を用いて種特異プライマーを設計した。また、非コード領域である HV (Hyper Variable) 領域の一部を増幅可能な、哺乳類および鳥類共通プライマーをそれぞれ設計した。各プライマーについてアニーリング温度および非特異増幅の有無を検討し、蛍光標識マルチプレックス PCR を行ったところ、一部のプライマーについては非特異増幅が確認され再設計が必要であると考えられたが、サンプルを入手できた動物24種については識別することが可能であった。また、遺伝的には同種であるブタ（西洋品種）とニホンイノシシを SNP（一塩基挿入）により識別できる可能性が示唆された。なお、本共同利用研究ではニホンザル6個体、アカゲザル6個体、タイワンザル2個体の試料を利用させていただいた。解析の結果、ヒト、ニホンザル、アカゲザルおよびタイワンザルについては、増幅産物長に大きな差はなかったものの、ヒト増幅産物に比べてニホンザルが2bp、アカゲザルが4bp、タイワンザルが5bp大きく、同一プライマーペアによって霊長類間を識別できると考えられた。

#### 2016-D-20 マーモセット人工哺育個体の音声発達

黒田公美（理研・BSI・親和性社会行動）、齋藤悠子（武蔵野大・教育・児童教育）、篠塚一貴、矢野沙織（理研・BSI・親和性社会行動） 所内対応者：中村克樹

家族で群れを形成し、協同繁殖をおこなうコモンマーモセットは、親子間関係の発達を知るうえで重要な知見をもたらしてくれる動物である。また、多様な音声コミュニケーションを行うことが知られている種でもあり、音声の発達の変化についても注目がなされている。愛着行動の発達を調べる方法として、古くから母子分離という方法がとられているが、実験目的の完全な分離は倫理的な問題があり、近年では行われなくなった。マーモセットは、通常双子を出産するが、飼育下では三つ子以上の出産がみられ、その場合、親が育てられるのは2頭までであるため、人工哺育が行われ、養育者から完全に分離された状態になるが、母子分離、音声発達の観点から人工哺育個体の音声の詳細について分析を行った研究はない。そこで、本研究では、上記事情により人工哺育がなされた個体5頭および、コントロール群として同様の家族で養育された個体4個体を対象に、15分間の音声録音を行った。途中ヒトがエサを提示し、それらの刺激に対する反応も分析した。記録した音声・動画から、発声頻度の測定、音声の分類を行った。その結果、人工哺育個体は、通常養育個体に比べ、ヒトがエサを提示した場面で、ネガティブな発声（警戒音、不安時の音声）を発することが多い傾向がみられた。

#### 2016-D-21 飼育下のニホンザルおよびアカゲザルにおける *Bartonella quintana* の分布状況とその遺伝子系統

佐藤真伍（日本大・獣医公衆衛生） 所内対応者：岡本宗裕

*Bartonella* 菌は哺乳類の赤血球内に持続感染する細菌で、少なくとも14菌種2亜種が人に対して病原性を有する。これらのうち、*Bartonella quintana* は、第一次・第二次世界大戦時に兵士の間で流行した塹壕熱の原因菌として古くから知られている。近年では、中国や米国で実験用に飼育されていたアカゲザルやカニクイザルからも *B. quintana* が分離されている。また、野生のニホンザルにも *B. quintana* が分布していることが明らかとなっている（13.3%；6/45頭）。

本研究では、京都大学霊長類研究所内で飼育されているニホンザル173頭およびアカゲザル101頭について、*B. quintana* の保菌状況を細菌学的に検討した。その結果、和歌山県由来の椿群のニホンザル1頭（個体#：TB1）から *Bartonella* 菌が分離（添付図）され、菌種同定の結果、*B. quintana* と同定された。一方、その他のサルから本菌は分離されなかった。

今後、TB1から分離された株について、複数の遺伝子領域を用いて遺伝子型別する Multi-locus sequence typing (MLST) によって解析するとともに、同個体における持続感染の有無についても検討していく必要があると考えられた。

#### 2016-D-23 霊長類ゲノム解析を通じたウイルス感染制御遺伝子の進化に関する研究

佐藤佳、小柳義夫、三沢尚子、中野雄介（京都大・ウイルス・再生医科学研）、中川草（東海大・医）、上田真保子（東海大・マイクロ・ナノ研究開発） 所内対応者：今井啓雄

年度途中（12月）の採択であったため、使用できる試料を入手できなかった。  
平成29年度より本格的に研究が始動すると思われる。使用できる試料が入手でき次第、解析を開始する。

#### 2016-D-24 中部地域における飼育チンパンジーの父系についての実態調査

奥村文彦（日本モンキーセンター） 所内対応者：友永雅己

チンパンジーはIUCNが定める絶滅危惧種であり、飼育個体群を持続的に維持管理することは保全に直接貢献する。2016年10月現在、チンパンジー317個体が日本で飼育されており、これらは日本動物園水族館協会（JAZA）によって血統管理されている。血統登録台帳から、各個体が残した子孫の数を知ることができるものの、現在の飼育状態（どの個体と同居しているのか）や繁殖能力（交尾や育児に関する行動特性）が記載されていないために、今後繁殖する可能性があるのかどうかを判別できず、飼育個体群の動態予測は非常に難しい。特に、雌に比べて雄は一部の少数個体のみが繁殖しており、飼育個体群内の遺伝的多様性を保つためには子孫を残した父系の規模を明らかにする必要がある。そこで中部地域の飼育施設を対象に、繁殖の可能性がある雄の個体数および父系の数を明らかにすることを目的として飼育状況調査を行った。

中部地域には10の飼育施設で63個体のチンパンジーが飼育されている。雄の総数は26個体で、繁殖実績のある個体は8施設で13個体であった。その年齢は19歳から50歳の範囲であり、平均年齢（±SD）は34.5±8.4歳で雌と同居しているのは11個体であった。繁殖制限されていない個体はそのうち6個体である。他の2個体のうち1個体は雄同士で同居し、1個体は単独飼育となっている。ファウンダーとなる雄は6個体であった。繁殖実績はないが交尾が過去に確認されている、または成育歴や社会性から交尾可能と推測される雄は5施設に5個体であった。その年齢は2歳から19歳の範囲であり、平均年齢（±SD）は9.8±6.6歳ですべて繁殖実績のある雄の子孫である。

今後は飼育下個体群の持続的管理のため、こうした情報を飼育施設間で積極的に交換し、未繁殖個体の遺伝子を次世代に残せるよう個体レベルでの繁殖計画の立案と着実な実行が急務である。



#### 2016-D-25 サル初代分離細胞における変異型サル免疫不全ウイルスの増殖

塩田達雄、中山英美、齊藤暁（大阪大学微生物病研究所） 所内対応者：明里宏文

本年度、3頭のカンクイザル血液から分離したCD4陽性T細胞において、カプシド領域に点変異を導入することで非分裂期細胞に感染しないよう変化した変異型サル免疫不全ウイルス（SIV）の増殖特性を調べた。その結果、変異型SIVの増殖は野生型SIVとほぼ同程度であることがわかった。今回用いたCD4陽性T細胞はPHAおよびIL-2を用いて活性化状態を誘導してから感染に用いたことから、少なくとも活性化CD4陽性T細胞での増殖において変異の影響は限定的であることが示唆された。次年度以降は、マクロファージおよび静止期CD4陽性T細胞を用いた感染実験を行うことで、これらの細胞種における変異の影響を明らかにしていきたい。また、アカゲザルとカンクイザルではSIVに対する感受性が異なるという過去の報告があるため、それぞれの血液から採取した細胞を用いて、ウイルス感染実験を行い比較検討していきたい。

#### 2016-D-26 Sequencing of huntingtin orthologs in several primate species

Elena Cattaneo、Giulio Paolo Formenti (University of Milan) 所内対応者：今井啓雄

Within the framework of the project "Intermediate allele identification in non-human primates through Htt Exon1 sequencing" I have spent three weeks at Primate Research Institute with the general goal of sequencing Htt orthologs (rHtt – real Htt) and paralogs (pHtt) in up to 107 samples belonging to different individuals from 34 non-human primate species. These samples were available through PRI and their collaborators (essentially Japanese Monkey Center – JMC). We are after the identification, if present, of a primate species with Htt genetic features similar to humans (i. e. high number of CAG repeats). Incidentally, the presence of an Htt pseudogene (pHtt) in the family of Callithricidae could also be investigated.

When at PRI, I immediately met the PRI collaborator from the Japanese Monkey Center at their annual meeting to establish a cooperative research effort that would have allowed samples retrieval. During the same meeting I have also presented in public our experimental plan.

After PRI 50th anniversary I have installed in the laboratory, verified the presence of all consumables that were previously ordered and started a series of preliminary experiments with the DNA already available.

While the preliminary experiments were on-going (PCR amplification, cloning, plasmid extraction and sequencing) I received a first batch of 12 from PRI tissues by Dr. Nagume Tani for DNA extraction, from which DNA was extracted and the samples were also processed. That week I have also presented our experimental plan to the weekly meeting of the Molecular Biology Section.

Finally, we could meet with Dr. Takashi Hayakawa from JMC to decide which samples to process from their tissue bank. We firstly decided to focus on New World Monkeys (100 samples): some of them harbour both rHtt and pHtt and represent a group of usually small primates, potentially suitable for disease modelling.

While I kept processing the first 12 samples from PRI I have prepared the first 21 tissue samples from JMC for DNA extraction. However I have noticed that when amplifying the Callithricidae samples, where both rHtt and pHtt is present, we get preferential amplification of pHtt over rHtt. So I designed a new strategy to selectively amplify the rHtt in those species. Despite this, amplification of rHtt in three new species (*S. sciureus*, *A. trivirgatus*, *A. belzebuth*) was achieved.

Results from sequencing of the samples from first 12 samples from PRI suffers the same issue reported above (i. e. preferential amplification of pHtt over rHtt) and moreover in JMC samples pHtt is present where it should not suggesting that there could have been some DNA contamination in the sample. This is possible since Dr. Hayakawa had reported that several of these samples were very old.

I have cloned and sent plasmid for sequencing from tissue samples of JMC, and started to apply the new strategy for assessing only rHtt.

Unexpected events related to personal matters forced me to return back to Italy ahead of time. At that point, results of sequencing for JMC samples were not conclusive. They suggested that some contamination is likely to be present but that it is also possible to sequence rHtt/pHtt from them. I was also unable to obtain results for the new strategy for assessing only rHtt in time. However I have applied it successfully once back in Italy, implying that it can be used also on the Japanese samples.

### 3. 平成28年度で終了した計画利用研究

#### アジア産霊長類の進化と保全に関する国際共同研究

実施期間 平成26～28年度

課題推進者 川本芳、マイケル・ハフマン、半谷吾郎、辻大和、アンドリュー・マッキントッシュ、田中洋之

本課題は、生態学・行動学・集団遺伝学・寄生虫学の視点から、アジア産霊長類の進化ならびに保全に関わる研究を推進することを目的に3年計画で実施した。原則的に海外研究者を含む研究課題を採択し、国際共同研究を活性化させることに重点を置く計画とした。この結果、3年間にアジアの6カ国（ミャンマー、スリランカ、ネパール、ブータン、ベトナム、台湾）から7名延べ13件の応募を採択し共同研究を実施した。3年目には研究所で初めて共同利用研究会を海外（スリランカ）で開催し、課題研究の情報交換と研究成果の総括を行った。この結果、①種の多様性と系統あるいは系統地理、②多様な環境における個体群生態、③人との摩擦および保全管